

1649

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

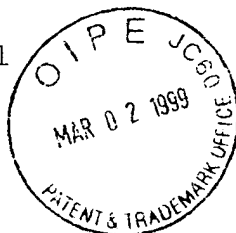
#3/42
03/05/99

Applicant: HIEI, Yukoh et al

Application No.: 09/229,324

Filed: January 13, 1999

For: METHOD FOR TRANSFORMING MONOCOTYLEDONS



Group:

Examiner:

LETTER

Honorable Commissioner of Patents
and Trademarks
Washington, D.C. 20231

March 2, 1999
0760-0262P

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the applicant hereby claims the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	204464/92	07/07/92

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By:

DONALD J. DALEY

Reg. No. 34,313

P. O. Box 747

Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment
(703) 205-8000
/dp

Birch Stewart et al
703-205-8000
0760-262 P
Yukoh HIEL
09/229, 324

日本国特許庁

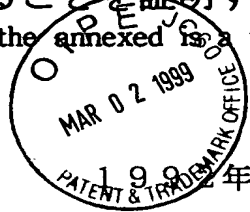
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

(21)

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:



1999年 7月 7日

出願番号
Application Number:

平成 4年特許願第204464号

出願人
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

RECEIVED

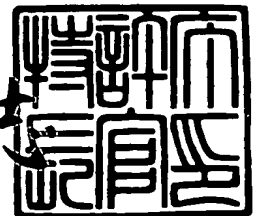
MAR 5 1999

MARKETING
SERVICE CENTER

1999年 1月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3002577

【書類名】 特許願

【整理番号】 92229

【提出日】 平成 4年 7月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 単子葉植物の形質転換方法

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 日本たばこ産業株式会社
 社遺伝育種研究所内

 【氏名】 樋江井 祐弘

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 日本たばこ産業株式会社
 社遺伝育種研究所内

 【氏名】 小鞠 敏彦

【特許出願人】

 【識別番号】 000004569

 【郵便番号】 140

 【住所又は居所】 東京都品川区東品川四丁目 1 2 番 6 2 号

 【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

 【代表者】 水野 繁

 【電話番号】 03(3474)3111

【代理人】

 【識別番号】 100088546

 【郵便番号】 102

 【住所又は居所】 東京都千代田区飯田橋 4 丁目 5 番 1 2 号 岩田ビル 6 階
 谷川国際特許事務所内

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

【納付方法】 特許印紙

【納付金額】 14,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 9100569

【書類名】 明細書

【発明の名称】 単子葉植物の形質転換方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法。

【請求項2】 前記単子葉植物はイネである請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記アグロバクテリウム属細菌は、Agrobacterium tumefaciens のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域由来のDNA領域を含むプラスミドを導入したアグロバクテリウム属細菌である請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 前記プラスミドはpTOK162 又はその誘導体である請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記アグロバクテリウム属細菌は、Agrobacterium tumefaciens である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 形質転換操作に用いるアグロバクテリウム属細菌の菌濃度が $10^7 \sim 10^{10}$ 細胞/mlである請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 前記培養組織はカルス誘導培地に置床後2日以上のカルス形成過程にある培養組織又はカルスである請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 培養組織が正常な個体を再生する能力を有する組織である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法（PEG法）、パーティクルガン法その他が知られている。

【0003】

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることによりDNAを細胞内に導入し、形質転換を図る方法である。現在、最も再現性のある手法で、この方法で種々の遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている（Toriyama K. et al., 1988; Biotech. 6:1072-1074, Shimamoto K. et al., 1989; Nature 338:274-276, Rhodes C. A. et al., 1989; Science 240:204-207）。しかしながら、この方法は、1）プロトプラストからの個体再生系が確立されている植物種にのみ適用可能である、2）プロトプラストから個体再生までには数か月を要するので、形質転換体を得るのに時間がかかる、3）培養期間が長期化するので、それに伴う培養変異の頻度が高くなり、正常な形質転換体を得る確率が低くなる、という問題点を有する。

【0004】

PEG法は、目的遺伝子とプロトプラストとを混合し、PEGで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは電気刺激がPEGに変わった点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション法よりはいくぶん低いと考えられる。この方法で形質転換体を得た報告はあるものの、広く用いられているとは言い難い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション法と同様な問題点を持つ（Zhang W. et al., 1988; Theor. Appl. Genet. 76:835-840, Datta S.K. et al., 1990; Biotech. 8:736-740）。

【0005】

パーティクルガン法は、目的の遺伝子を微細な金属粒子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいは組織に打ち込むことによって形質転換を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行うことができ、特に、プロトプラストからの再生系が確立されていない植物種に有効である。形質転換効率は、遺伝子を打ち込んだ後の選抜に依存する。エレクトロポレーション法と効率を比較したデータはない（Gordon-Kamm W. J. et al., 1990; Plant Cell

2:603-618, Fromm M.E. et al., 1990; Biotech, 8:833-839, Christou P. et al., 1991; Biotech. 9:957-962)。

【0006】

その他の方法としては、1) 種子、胚とDNAの共存培養(Topfer R. et al., 1989; Plant Cell 1:133-139, Ledoux L. et al., 1974 Nature 249:17-21)、2) 花粉管への処理(Luo and Wu 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6:165-), 3) リポソーム法(Caboche M. 1990; Physiol. Plant. 79:173-176, Gad A. E. et al., 1990:177-183)及び4) マイクロインジェクション法(Neuhaus G. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75:30-36)があるが、形質転換の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言い難い。

【0007】

一方、アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドをベクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ペチュニア、ナタネ等の双子葉作物の形質転換法として普遍的に用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の宿主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には寄生しないとされている(De Cleene M. 1976; Bot. Rev. 42:389-466)。

【0008】

アグロバクテリウムによる単子葉植物の形質転換に関してはアスパラガス(Byteler B. et al., 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA:84:5345-5349)、そしてヤマ(Dioscorea bulbifera)(Schaferw, et al., 1987; Nature 327:529-532)で報告されているが、その他の単子葉植物、特にイネ科作物にはこの方法を適用できないとされている(Potrykus I. 1990; Biotechnology 8:535-543)。

【0009】

Grimsley et al, 1987: Nature 325:177-179はアグロバクテリウムのT-DNAの中にトウモロコシストリークウイルス(Maize streak virus)のDNAを挿入したものをトウモロコシの生長点に接種したところ、トウモロコシストリークウイルスの感染を確認したことを報告している。トウモロコシストリークウイルスのDNAを接種しただけではこのような感染症状が認められないことから、上の観察結果はアグロバクテリウムがトウモロコシにDNAを導入することができ

ることを示すものと解釈している。しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれなくても増殖する可能性があるので、この結果はT-DNAが核に組み込まれたことを示すものではない。その後、感染効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種した時が最も高く (Grimsley et al., 1988; Biotech. 6:185-189)、感染にはアグロバクテリウムのプラスミドのvirC遺伝子が必須であることを示した (Grimsley et al., Mol. Gen. Genet. 217:309-316)。

【0010】

Gould J. et al, (1991; Plant Physiol. 95:426-434) はトウモロコシの生長点に針で傷をつけた後カナマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を持った強病原性アグロバクテリウムEHA1を接種し、処理後の生長点をカナマイシンで選抜したところ、抵抗性を示す植物体を得た。この後代の種子の一部は導入した遺伝子を持つことをサザン分析で確認した (キメラ現象)。

【0011】

Mooney P.A. et al., (1991) Plant Cell, Tissue, Organ Culture 25:209-218 は、アグロバクテリウムを用いて小麦の胚にカナマイシン抵抗性遺伝子の導入を試みた。まず、胚を酵素で処理し、細胞壁に傷をつける処理をし、その後アグロバクテリウムを接種した。処理したカルスのうち極めて少数のカナマイシン抵抗性と思われるカルスが増殖したが、このカルスからの植物体の再生はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルスで導入遺伝子の構造変異が見られた。

【0012】

Raineri et al, 1990; Biotech. 8:33-38 はイネの胚盤に傷をつけた後、強病原性のアグロバクテリウムA281 (pTiBo542) をイネの8品種に処理したところ、日本晴、藤坂5号の2品種で腫瘍状の組織の増殖が見られた。さらに、T-DNAからホルモン合成遺伝子を除いたTiプラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を挿入したプラスミドを持つアグロバクテリウムをイネの胚に接種したところカナマイシン抵抗性カルスの増殖が見られた。この抵抗性カルスではGUS遺伝子の発現が認められたが、形質転換植物を得ることはできなかった。これらのことから、アグロバクテリウムのT-DNAがイネ細胞に導入さ

れたと解釈している。

【0013】

このように、イネ、トウモロコシ、コムギ等のイネ科の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能であることを示唆する研究報告が現れてきているが、まだ、再現性、導入効率、さらには遺伝子の導入の確認についても完全に説得できる結果を示しているとは言い難い (Potrykus I. 1990; Biotech. 8:535-543)。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法が主流であるが、プロトプラストを用いるため、再生植物を得るまで長期間を要し、多大な労力がかかり、また長期間の培養により高頻度で変異体が出現するという危険性がある。また、この方法はプロトプラストからの再分化系が確立されていない作物、例えばトウモロコシには適用できない。そこで、上述のように、トウモロコシに対しては、生長点組織を用いることが試みられている (Gould J. et al., 1991)。しかし、生長点を単離する作業は多くの労力を要し、大量に調製することは必ずしも容易ではない。

【0015】

従って、本発明の目的は、従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供することである。

【0016】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子葉の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びバイナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の培養組織をアグロバクテリウム属細菌を用いて飛躍的に高い効率で再現性をもって形質転換することができることを見出し、これによれば上記目的を達成することができることを見出し、本発明

を完成した。

【0017】

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供する。

【0018】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

【0019】

本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植物にも適用可能である。

【0020】

また、本発明の方法に供される培養組織は、いかなる部位由来のものであってもよく、例えば、胚盤、茎頂、幼根、花粉及び葯由来のものを挙げることができる。培養組織としてはカルスが好ましい。カルスの誘導は、各植物について従来より公知の方法により行うことができる。もっとも、培養組織は必ずしもカルスである必要はなく、懸濁細胞であってもよい。

【0021】

形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを用いることができる。これらのものの多くは Agrobacterium tumefaciens 由来の Ti プラスミドのヴィルレンス領域 (vir 領域) 由来の DNA 領域を含むベクターを有しており、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入されるか又はこのベクターとは別のプラスミド中に存在し、相同組換え等により Ti プラスミド中に in vivo で挿入されるものである。また、本願発明者らは、先に、Agrobacterium tumefaciens A281 という強病原性の、形質転換効率が極めて高い株 (フッドら、Bio/Technol、2:702-709、1984年、フッドら、J. Bacteriol.、168:1283-1209、1986年、コマリら、J. Bacteriol.、166:88-94、1986年、ジンら、J. Bacteriol.、169:4417-4425、1987年、コマリ、Plant Science、60:223-229、198

9年、ATCC 37349)に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域(vir領域)由来のDNA領域を含むベクター(本明細書において、このベクターを「スーパーバイナリーベクター」と呼ぶことがある)を開発した(特願平2-411681号)。このようなスーパーバイナリーベクターを本発明において好ましく用いることができる。

【0022】

このようなスーパーバイナリーベクターの例としてpTOK162を挙げることができる。その構造を図1に示す。このプラスミドは、大腸菌及びAgrobacterium tumefaciens中で増殖可能であるpTOK154と呼ばれるプラスミド(Tiプラスミドから誘導された公知のpGA472プラスミドとpVCK101と呼ばれる公知の広宿主域プラスミドから後述の方法により構築された、T領域を含むプラスミド)にpTiBo542のヴィルレンス領域由来の既にクローン化されていた上記15.2キロベースのKpnI断片(virB、virG、virC各遺伝子を含む)を組み込んだものである。このpTOK154には、T領域の2つの境界配列とその間に単子葉植物に導入しようとする遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子が配列されており、この例は、単子葉植物に導入しようとする遺伝子がpTiBo542のヴィルレンス領域由来のクローン化されたDNA断片を含有するプラスミド上に配置されている例である。

【0023】

単子葉植物に組み込もうとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、プラスミドが有する薬剤耐性等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。もっとも、図1に示すpTOK162のように、大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをT領域内に導入することが必ずしも容易ではないことがある。このような場合には、Agrobacterium tumefaciens細胞内のin vivo系での相同組換え(ヘレラーエステレラら、EMBO J.2:987-995, 1983年、ホーチら、Science, 223:496-498, 1984年)を利用することにより、目的のDNAをpTOK162に導入することが可能になる。すなわち、例えば、先ず、pTOK162をAgrobacterium tumefaciensに導入しておいて、この菌にさらに所望DNAを導入したpBR322と呼ばれるプラスミド(類似のプラスミドを含む)を導入する

。pTOK162 のDNAにはpBR322と相同な部分があるので、pBR322誘導体は相同配列を介した組み換えによりpTOK612 に組み込まれることになる。pBR322はpTOK162 と異なりAgrobacterium tumefaciens 中では複製できないので、このような組み込まれた状態（pTOK162::pBR322 誘導体という）でなければAgrobacterium tumefaciens 中で生存することができない。そして、pTOK162 とpBR322誘導体のそれぞれに特異的な特性（薬剤耐性等）について選抜すれば、pTOK162::pBR322 誘導体を有するAgrobacterium tumefaciens を得ることができる。さらに、pTOK162 を有するAgrobacterium tumefaciens に各種のプラスミドを導入して研究したところ、pBR322誘導体の選抜マーカーとしては、トランスポゾンTn7（デグリーブら、Plasmid 6: 235-248, 1981）由来のスペクチノマシン耐性遺伝子（SP）が優れていることが判明した。従って、すでに所望の遺伝子がpBR322にクローン化されている場合には、SP遺伝子をそのプラスミドに挿入すれば、Agrobacterium tumefaciens 内の相同組み換えにより、pTOK162 のT領域に所望の遺伝子を導入することができる。またその他の場合には、pBR322由来のDNAとSP遺伝子から構成されるプラスミドを用意しておいて、これに所望の遺伝子を挿入する方法も考えられる。この際、T領域の境界配列を活用すれば、最終的に、pTOK162 上において、カナマイシン耐性遺伝子と所望の遺伝子を別々のT領域中に配置することも可能である。カナマイシン耐性をマーカーとして植物を形質転換した場合、両T領域とも導入される場合も相当の比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分達成できる。また、両T領域が別々の染色体に組み込まれる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子から分離することも可能となる。

【0024】

寄主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、Agrobacterium tumefaciens を好ましく用いることができる。

【0025】

プラスミドをAgrobacterium tumefaciens 等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例えば、細菌の三系交雑手法（ディッターら、Pro.Natl.Acad.Sci.USA, 77:7347-7351, 1980年）により行うことが

できる。

【0026】

このようにして調製されるアグロバクテリウム属細菌には、pTOK162 由来のウイルス能力の高いDNAが含まれるので、高い効率で単子葉植物の形質転換を行うことが可能である。

【0027】

尚、本発明においては、単子葉植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様にT領域の境界配列の間に配置されるものであるが、アグロバクテリウム属細菌中で、Tiプラスミド上に配置されてもよく又は他のプラスミド上に配置されてもよい。

【0028】

アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の培養組織を形質転換する方法は、培養組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^7 \sim 10^{10}$ 細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に培養組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。あるいは、培養組織の培養液中にアグロバクテリウム属細菌を添加して共存培養することにより形質転換を行うこともできる。

【0029】

形質転換した培養組織は、その後、公知の方法により培養を行う。これにより、形質転換により所望の形質を獲得した植物体を再生することができる。

【0030】

【発明の効果】

本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物に目的の外来遺伝子を再現性良く導入することが初めて可能になった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質転換方法はこれまでもあるが、前述のとおり確立された方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまでに用いられていない培養組織に本発明で改良した方法でアグロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺伝子を導入することができた。本発

明の方法では、材料調製が容易なカルス等の培養組織を用いるので、生長点を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることができる。また、培養組織を形質転換するので、プロトプラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーバイナリーベクターを用いれば、一部のイネの品種のように培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入することが可能になった。さらに、後述の実施例に記載するように、適切な接種後の選抜法を採用すれば、目的遺伝子がキメラ状に導入されるキメラ現象を低減させることもできる。

【0031】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0032】

(1) 供試培養組織の調製

(i) イネの品種

日本稲品種、朝の光、月の光及びコシヒカリを選定して供試した。

【0033】

(ii) 胚盤、胚盤カルス

イネの完熟種子を70%エタノールに1分間、1%次亜塩素酸ナトリウムに30分間浸漬することによって消毒した後、2N6固体培地（N6の無機塩類及びビタミン類(Chu C.C. 1978; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp.43-50)、1g/1カザミノ酸、2mg/1 2,4-D、30g/1ショ糖、2g/1ゲルライト）に置床した。また、完熟種子を置床後4日目に種子より胚盤部位を摘出し胚盤として供試した。約3週間培養後、形成された胚盤由来のカルスを2N6培地に移植し、4日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

【0034】

(iii) 茎頂組織

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2N6固体培地（1/2量の

N 6 の主要無機塩類及び微量塩類、N 6 ビタミン類、1 g / 1 カザミノ酸、20 g / 1 ショ糖、2 g / 1 ゲルライト) に置床し、培養3日後の幼苗から、頂端分裂組織を含む2~3 mmの組織を切り出し、材料とした。

【0035】

(iv) 幼根組織、幼根カルス

(iii) の方法で得た幼植物体から種子根の先端部を5~10 mm切り出して材料とした。また、これらの幼根を2 N 6 固体培地上で約2週間培養して得たカルスを幼根カルスとして用いた。

【0036】

(v) 懸濁培養細胞

(ii) の方法で得た胚盤由来のカルスをA A液体培地 (AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類 (Toriyama and Hinata 1985; Plant Science 41:179-183, MS微量塩類 (Murashige and Skoog 1962; Physiol. Plant. 15:473-497) 、0.5 g/l カザミノ酸、1 mg / l 2,4-D、0.2 mg/l カイネチン、0.1 mg/l ジベレリン、20 g / 1 ショ糖) に移し、25℃、暗黒下で120 rpmで振盪することによって懸濁培養細胞を得た。なお、培地の更新は1週間毎に行った。

【0037】

(2) Ti プラスミド (バイナリーベクター)

ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT) 及びGUS遺伝子をTi プラスミドのT-DNA領域に組み込んだ、以下のプラスミドを作製した。

【0038】

(i) pIG121 Hm: ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イントロンを含むGUS遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子と連結したプラスミド (中村ら、1991; 植物バイオテクノロジーII (現代化学増刊、pp.123-132) 。名古屋大学、中村氏より入手)。

【0039】

(ii) p TOK 232 :

1. イントロンGUS及びハイグロマイシン抵抗性遺伝子の中間ベクター p TOK 229 への導入

Tn 7由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含むC1a I断片(2.5 kb)をクレノー処理により末端を平滑化し、これをpUC19のSma I部位に挿入し、アンピシリン及びスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つプラスミドpTOK107(5.2 kb)を得た。pTOK107をEcoRI、HindII Iで処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む2.5 kb断片をpGA482のEcoRI、HindIII断片(2.7 kb)と連結し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子とHindIII、Hpa I部位を含むpTOK170(5.2 kb)を得た。

【0040】

85Sプロモーターにヒマのカタラーゼの第1イントロンとGUS遺伝子を連結したベクターpIG221(Ohta et al., 1990,名古屋大学中村氏より譲渡)をEcoRIで切断後クレノー酵素により末端を平滑化しHindIII リンカー(pCAAGCTTG; タカラ酒造コード4660P)を挿入した。35Sプロモーター及びイントロンGUSを含む断片をHindIIIにより切り出し、35Sプロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結したプラスミドpGL2(J. Paszkowski, Friedrich Miescher Instituteより入手)のHindIII部位に挿入しpGL2-IG(7.6 kb)を得た。なお、pGL2はpDH51(Pietrazak et al., 1986; Nucleic Acids Research 14:5857-5868)にハイグロマイシン抵抗性遺伝子(Gritz L. and Davis J. 1983; Gene 25:179-188)を挿入したものである。pTOK170をHpa I処理して得られた断片をpGL2-IGのPvuII断片(5.2 kb)と連結しpTOK229(10.1 kb)を得た。

【0041】

2) スーパーバイナリーベクターpTOK162への導入

バイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA281由来のvirB、virC、virG遺伝子を挿入して得たスーパーバイナリーベクターpTOK162への目的遺伝子(ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGUS遺伝子)の導入は相同組換えによって行った。すなわち、両ベクターは大腸菌プラスミドpBR322に由来する部位を持つので、スペクチノマイシン、カナマイシ

ンで選抜された菌には両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが含まれることになる。スーパーバイナリーベクターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGUS遺伝子が組み込まれたプラスミドをpTOK232と呼ぶ(図1参照)。

【0042】

(3) 寄主アグロバクテリウム

T-DNA 領域を削除した菌系、LBA4404とEHA101とを寄主バクテリアとして使用した。LBA4404はヘルパープラスミド(vir領域を完全な形で持つ)PAL4404を有する菌系であり、American Type Culture Collectionより入手可能である(ATCC 37349)。EHA101はヘルパープラスミドのvir領域が強病原性アグロバクテリウムA281由来であり、Hood E. E. et al. 1986から入手可能である。

【0043】

(2) 項で述べた種々のバイナリーベクターをこれら2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の菌系を遺伝子導入用として用いた。これらのプラスミドをアグロバクテリウムに導入する方法は細菌の三系交雑手法(Ditta G. et al. 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351)によった。

LBA4404(pTOK232)

LBA4404(pIG121Hm)

EHA101 (pIG121Hm)

【0044】

(4) アグロバクテリウム懸濁液の調製

ハイグロマイシン(50 μ g/ml)とカナマイシン(50 μ g/ml)を含むAB培地(Drlica K. A. and Kado C. I. 1974; Proc. Natl Acad. Sci. USA 71:3677-3681)上で3~10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地(前述のAA培地において、ショ糖を0.2M、グルコースを0.2Mに変更し、アセトシリングンを100 μ M添加、pH5.2)に懸濁し、菌濃度を $3 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/mlに調整し接種に用いた。

【0045】

(5) 接種条件

供試組織を滅菌水で洗浄後、上述のアグロバクテリウムの懸濁液に3～10分間浸漬した。浸漬処理後、茎頂組織は100 μ M アセトシリンゴン、10g/l グルコース、20g/l ショ糖を含むN6S3固体培地(1/2 N6 主要無機塩類、N6微量塩類、N6ビタミン類、Chu C.C.1978、AAアミノ酸(Toriyama and Hinata 1985), 1g/l カザミノ酸、0.2 mg/l NAA、1.0 mg/l カイネチン、3g/l ゲルライト)に、胚盤カルスなどのその他の培養組織はアセトシリンゴン、グルコース、ショ糖を同濃度で含む2N6固体培地に移植し、25℃、暗黒下で2～5日間培養した。その後、接種組織を250 mg/l セフォタキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフォタキシムを含むそれぞれの固体培地で培養を続けた。

【0046】

(6) GUS活性の調査方法

共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100 を含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを洗浄除去した後、0.1 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルコン酸(X-gluc)及び20%メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供試組織数に対する百分率で表した。なお、選抜処理後得られた形質転換体と考えられる植物体でのGUS活性の判定に際しては、植物体から葉片を採取し、同様な方法に従ってGUS染色を行った。

【0047】

(7) 形質転換細胞、組織の選抜

(i) 茎頂組織

5日間アグロバクテリウムと共存培養した茎頂組織を250 mg/lセフォタキシムを含むN6S3培地で2週間培養し、生長した茎頂組織を40 mg/lハイグロマイシンを含むN6S3培地に移して、形質転換体の選抜を行った。

【0048】

(ii) 培養組織(胚盤カルス)

3日間共存培養した培養組織を、250 mg/lセフォタキシムを含む2N6培地で1週間培養した後、同培養組織を50 mg/lハイグロマイシンを含む2

N6培地で3週間培養してハイグロマイシン抵抗性の培養組織を選抜した（1次選抜）。得られた抵抗性組織をさらに50mg/lハイグロマイシンを含むN6-12培地（N6無機塩類、N6ビタミン類、2g/lカザミノ酸、0.2mg/l2,4-D、0.5mg/l6BA、5mg/lABA、30g/lソルビトール、20g/lショ糖、2g/lゲルライト）で2～3週間培養し（2次選抜）、この培地上で増殖したカルスを0、20、50mg/lハイグロマイシンを含む個体再生用培地N6S3に移した。なお、共存培養後の培地には全て250mg/lセフトキシムを添加した。

【0049】

(8) イネでの供試材料の違いによる遺伝子導入効率（共存培養後におけるGUS発現）

アグロバクテリウムが単子葉作物の細胞に遺伝子を導入することが可能であることを確認するため、強病原性のvir領域を持つアグロバクテリウムEHA101にハイグロマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を持つバイナリーベクターpIG121Hm（上述）を導入した菌をイネ品種月の光の種々の組織に処理し、共存培養後にGUS活性を調査した。供試組織は茎頂、幼根、胚盤、幼根カルス、胚盤カルス及び懸濁培養細胞である。アグロバクテリウムで処理しなかった場合は、いずれの材料でも青色のGUS発現を示すものは認められなかった。一方、アグロバクテリウムEHA101（pIG121Hm）で処理した場合には、幼根を除く組織でGUSの発現が確認された。処理組織数に対する青色を呈する組織の割合では胚盤カルスが最も高かった（表1）。さらに、GUSを発現する組織の大きさでも胚盤カルスが優れていた。胚盤カルスに次いで高い導入率を示した組織は茎頂であったが、茎頂組織をハイグロマイシン抵抗性に関する選抜を行ったところ全ての組織が枯死し、抵抗性組織は得られなかった。茎頂は生長点を含む組織であるが、遺伝子の導入処理を行った後、抵抗性組織が増殖するためには、遺伝子が限られた生長点に導入される必要がある。アグロバクテリウムとの共存培養処理後、茎頂には多数の遺伝子が導入されているものの抵抗性組織が得られなかったことは、生長点近傍に導入される確率は低いと考えられる。このようなことから、アグロバクテリウムを用いる方法では、材料としては、胚盤カルス、あるいは

その他の組織からのカルスが適当と判断される。

【表 1】

表1 供試材料の違いによるGUS遺伝子の導入効率 (品種: 月の光、
菌系: EHA101/pIG121Hm)

供試組織	GUS+の組織数/処理組織数 (%)		処理組織に対する GUS染色部位の大きさ
	無処理区	処理区	
茎頂	0/ 30 (0)	109/157 (69)	+++
幼根	0/ 20 (0)	0/ 30 (0)	
幼根カルス	0/ 30 (0)	24/115 (20)	+
胚盤	0/ 50 (0)	8/ 89 (9)	+
胚盤カルス	0/141 (0)	312/395 (79)	+++
懸濁培養細胞	0/232 (0)	61/247 (25)	++

+: 1%以下、++: 1~10%、+++ : 10%以上

【0050】

この実験で使用したバイナリーベクター pIG121HmではGUS遺伝子のプロモーターの中にヒマのイントロンが挿入されているため、アグロバクテリウムの細胞の中ではGUS遺伝子は発現しないことが確認されている(中村ら、1991)。以上のことから、共存培養後のGUS遺伝子の発現を指標とした場合、アグロバクテリウムはイネ細胞に遺伝子を導入できることが確認された。

【0051】

(9) イネの品種による遺伝子導入効率の違い (共存培養後におけるGUS発現)

培養細胞の確立、培養細胞から個体再生に関しては大きな品種間差異が存在する (Mikami and Kinoshita 1988; Plant Cell Tissue Organ Cult. 12:311-314)。日本稲の中ではコシヒカリは培養が困難とされている。一方、前項で用いた月の光は比較的培養が容易である。アグロバクテリウムによる形質転換法を用いる場合、このような品種間差異があると実用的には不都合である。この点を明らかにするため、コシヒカリと月の光の培養容易性の異なる2品種を用いてアグロバクテリウムによる遺伝子導入効率の差異を調査した。供試組織は胚盤カルスとし、アグロバクテリウムとしてはEHA101 (pIG121Hm) 及びLBA4404 (pIG121Hm) を用いた。

【0052】

月の光では各実験を通じて90%以上のカルスでGUS活性が認められたが、コシヒカリではこれより低い率でGUS活性が認められた(表2)。従って、EHA101 (pIG121Hm) あるいはLBA4404 (pIG121Hm) を用いた場合には、導入効率に関する品種間差異があるものと解釈される。

【表2】

表2 アグロバクテリウムの菌系とイネ品種の違いによるGUS遺伝子の導入効率

		GUS+の組織数/処理組織数 (%)		
		菌 系		
品種	実験	LBA4404(pIG121Hm)	EHA101(pIG121Hm)	LBA4404(pTOK232)
月の光	1	67/70 (96)	78/87 (90)	64/66 (97)
月の光	2	72/86 (84)	68/73 (93)	82/82 (100)
コシヒカリ	1	46/135 (34)	43/116 (37)	124/131 (95)
コシヒカリ	2	28/107 (26)	81/143 (57)	102/103 (99)

【0053】

(10)アグロバクテリウムの菌系による遺伝子導入効率の違い（共存培養後におけるGUS発現）

EHA101 (pIG121Hm) はヘルパープラスミドに強病原性アグロバクテリウムA281のvir領域を持つ。LBA4404 (pIG121Hm) は通常のvir領域を持つ。一方、LBA4404 (pTOK232)はヘルパープラスミドのvir領域は通常型であるが、バイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA281のvir領域の一部の遺伝子を有する。そして、このバイナリーベクターはpTOK162 から派生したもので、LBA4404 (pTOK162)は双子葉作物の中でも形質転換の困難な植物種に極めて高率で形質転換を可能とした (Saito Y. et al., 1992; Theor. Appl. Genet. 83:679-683)。このように、強病原性のvir領域の存在そのもの、あるいは存在形態は形質転換の効率に大きく影響する可能性があ

る。そこで、強病原性の *v i r* 遺伝子に関して異なる上記の3種類のアグロバクテリウムを用いて、GUS 遺伝子の発現に関する導入効率を比較した。なお、供試材料はコシヒカリ、月の光の胚盤カルスである。

【0054】

強病原性の *v i r* 領域を持たない LBA4404 (pIG121Hm) でも両品種とも GUS 活性を示す組織が認められたが、コシヒカリではその率は30%程度と低かった。ヘルパープラスミドに強病原性の *v i r* を持つ EHA101 (pIG121Hm) ではコシヒカリの導入率はやや上昇した。バイナリーベクターに強病原性の *v i r* を持つ LBA4404 (pTOK232) ではコシヒカリでも月の光と同様に95%以上の組織で GUS 活性が認められた(表2)。さらに、GUS 活性を示すそれぞれの組織での青色領域の面積に関しては、LBA4404 (pTOK232) で最も大きく、高い導入率を示すことが観察された。

【0055】

(11) 菌系の違いによる選抜効率 (ハイグロマイシン耐性カルス)

上項と同じ3つの菌系を用いて、月の光、コシヒカリの胚盤カルスとの共存培養後のハイグロマイシン抵抗性カルスの選抜率に関する比較を行った。抵抗性カルスの出現率に関しては LBA4404 (pTOK232) が最も高く、抵抗性カルスの選抜率に関する品種間差異は認められなかった(表3)。LBA4404 (pIG121Hm) あるいは EHA101 (pIG121Hm) の2つの菌系では、選抜率は低く、さらに培養困難なコシヒカリではハイグロマイシン抵抗性カルスの出現は2%程度にとどまった。従って、イネの形質転換に用いるアグロバクテリウムとしてはバイナリーベクターに強病原性の *v i r* 遺伝子の一部を持つ LBA4404 (pTOK232) が最も優れていると判定される。

【表3】

表3 アグロバクテリウムの菌系の違いによる形質転換効率の違い (胚盤カルス)

		ハイグロマイシン抵抗性カルス数/処理カルス数 (%)		
		菌 系		
品種	実験	LBA4404 (pIG121Hm)	EHA101 (pIG121Hm)	LBA4404 (pTOK232)
月の光	1	91/338 (27)	139/301 (46)	169/305 (55)
月の光	2	59/421 (14)	66/425 (16)	110/360 (31)
月の光	3		10/521 (2)	174/644 (28)
月の光	4		20/349 (6)	100/349 (29)
コシヒカリ	1	6/269 (2)		65/283 (23)

【0056】

(12)ハイグロマイシン耐性形質転換体におけるGUS遺伝子の発現様式

このようにして得られた抵抗性カルスをさらに2次選抜にかけ、抵抗性カルスから個体を再生させた。再分化用の培地N6S3にハイグロマイシンを添加した区と無添加の区を設定したが、無添加の場合には、GUS活性がない個体あるいはキメラ状に活性を示す個体が多数出現した。しかし、再分化培地にハイグロマイシンを添加した場合はこのような個体は大幅に減少し、個体全体でGUS活性を示す再生個体が増加した(表4)。なお、アグロバクテリウムで処理しなかつ

た場合には、ハイグロマイシン抵抗性あるいはGUS活性を示す個体は得られなかった。従って、このようなハイグロマイシン抵抗性カルスから再生したGUS活性を全面に示す個体は形質転換体と考えられる。

【表4】

表4 ハイグロマイシン抵抗性カルスから再分化した植物におけるGUS遺伝子の発現（品種：朝の光、菌系：EHA101(pIG121Hm)

抵抗性カルス	再分化個体数	GUS遺伝子の発現		
		安定的陽性	キメラ	陰性
1	26	25	1	0
2	8	7	1	0

（個体の再分化までハイグロマイシンを添加）

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の方法に用いることができるアグロバクテリウム属細菌に含まれるプラスミドの一例であるpTOK162の構造と本発明の実施例で用いたプラスミドpTOK232の構築方法を示す図である。

【符号の説明】

- SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子
- HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子
- NPT カナマイシン抵抗性遺伝子
- TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子
- IG イントロンGUS遺伝子
- BR T-DNAの右ボーダー配列
- BL T-DNAの左ボーダー配列

vir B, C, G 強病原性アグロバクテリウムA281由来のvir領域

ORI ColE1の複製開始点

COS ラムダファージのCOS部位

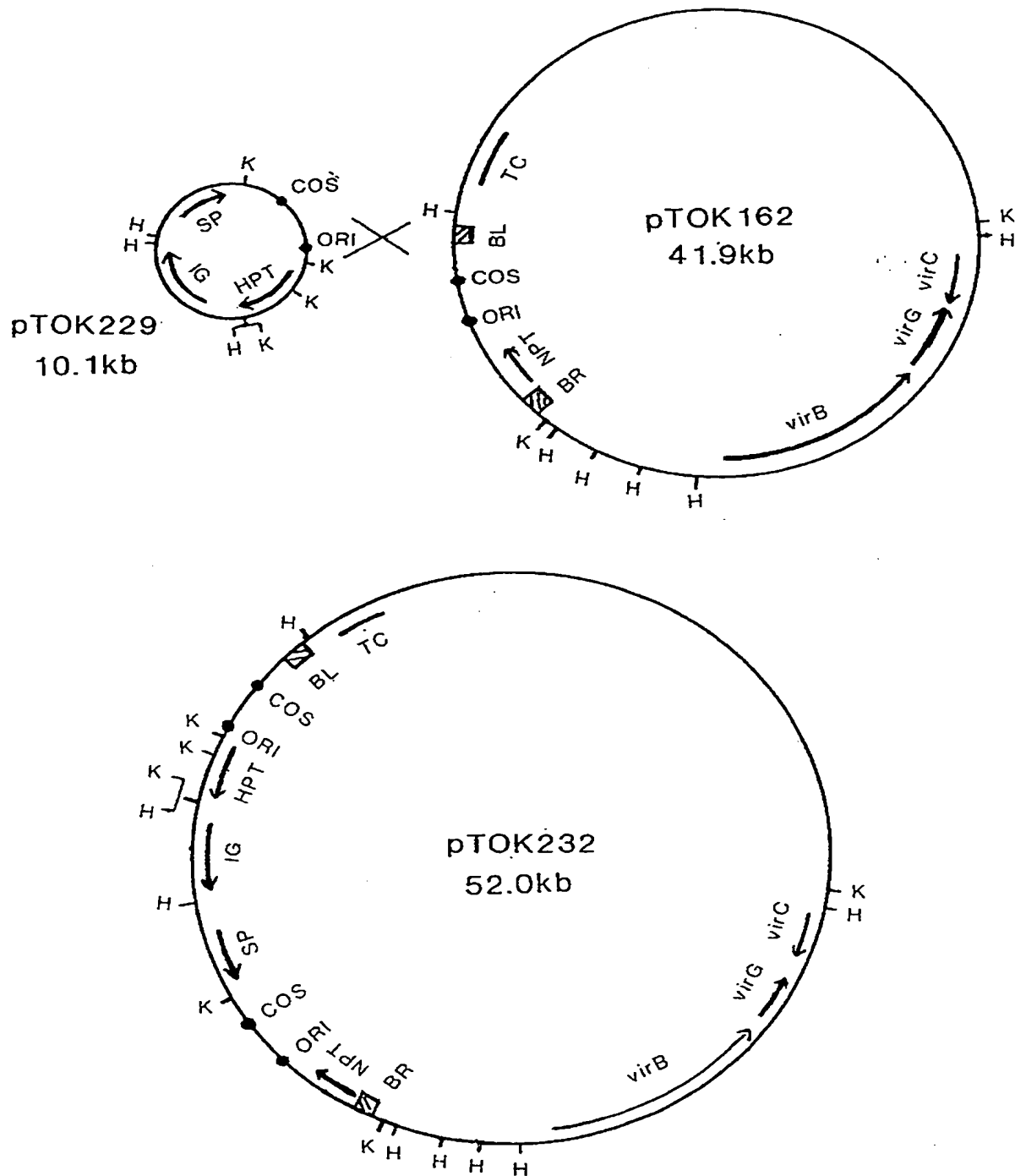
K 制限酵素KpnI部位

H 制限酵素HindIII 部位

【書類名】

図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、そのため変異体の出現の頻度が低く、また、プロトプラストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供すること。

【構成】 所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供した。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000004569
【住所又は居所】 東京都品川区東品川4丁目12番62号
【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100088546
【住所又は居所】 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル
6階 谷川国際特許事務所
【氏名又は名称】 谷川 英次郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1991年 7月 1日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都品川区東品川4丁目12番62号
氏 名 日本たばこ産業株式会社
2. 変更年月日 1995年 5月16日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名 日本たばこ産業株式会社